Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Wirkung von HCG auf den cytoplasmatischen Androgenrezeptor im ventralen Prostatalappen der Ratte während der Pubertät

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Peter Schönfeld
aus Mannheim

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536518_0009

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Wirkung von HCG auf den cytoplasmatischen Androgenrezeptor im ventralen Prostatalappen der Ratte während der Pubertät

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Peter Schönfeld
aus Mannheim

1984

Dekan:	Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Harzmann

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Funktionelle Bedeutung von Hormonen	1
1.2.	Testosteron und Androgenrezeptor	2
1.3.	Quantitative Bestimmung des Androgen-rezeptors	3
1.4.	Ziel der Arbeit	3
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Tiere	4
2.1.1.	Herstellung der Injektionslösung von HCg	5
2.2.	Chemikalien	6
2.2.1.	Humanes Choriongonadotropin	6
2.2.2.	Radioaktives Steroid	6
2.2.3.	Radioinertes Hormon	6
2.2.4.	Übrige Substanzen	6
2.3.	Radioaktivitätsmessung	7
2.4.	DNA-Bestimmung	7
2.5.	Proteinbestimmung	7
2.6.	Steroidrezeptoranalyse	8
2.7.	Inkubation	9
2.8.	Agarelektrophorese	10
2.9.	Auswertung der Agarelektrophorese	11
3.	Ergebnisse	14
3.1.	Erläuterung zu den Tabellen 1 bis 4	15
3.2.	Primäre Ergebnisse	16
3.3.	Graphische Darstellung der primären Ergebnisse	20
3.4.	Erläuterungen zu den Tabellen 5 bis 8	23
3.5.	Abgeleitete Ergebnisse	26
3.6.	Graphische Darstellung der abge-leiteten Ergebnisse	27

4.	Diskussion	28
4.1.	Tiere	28
4.2.	Aufbewahrung der Prostata	28
4.3.	Homogenisierung	28
4.4.	Markierung des Rezeptors	29
4.5.	Inkubationszeit und -temperatur	29
4.6.	Abtrennung des markierten Rezeptors	29
4.7.	Supprimierung der spezifischen Bindung	31
4.8.	Bestimmungsmethode	31
4.9.	HCg und seine Wirkung	32
4.10.	Wachstum der Prostata	32
4.11.	Cytosolisches Protein und DNA nach HCg-Stimulation	33
4.12.	Supprimierbare Bindung und HCg	34
4.13.	Rezeptorkomplexkonzentration und HCg-Einfluß	35
5.	Zusammenfassung	37
6.	Anhang	38

1. Einleitung

1.1. Funktionelle Bedeutung von Hormonen

Die Hormone erfüllen im wesentlichen drei Aufgaben:

1. Hormone ermöglichen und fördern die körperliche, geistige und sexuelle Entwicklung.
2. Hormone ermöglichen und fördern die Leistungsanpassung des Organismus.
3. Hormone sind zur Konstanterhaltung bestimmter physiologischer Größen z.B. des osmotischen Druckes, Blutzuckerspiegels ect. erforderlich.

Die Hormone sind somit als Glieder eines Regelungssystems zu betrachten (30). Alle diese Wirkungen werden durch Eiweiße vermittelt, die die Fähigkeit besitzen, das Hormon spezifisch zu binden und in der Zelle des Efolgsorgans ganz typische Reaktionen auszulösen (13). Diese Eiweiße, als Rezeptoren bezeichnet, sind für die Steroidhormone im Cytosol lokalisiert.

Diejenigen Prozesse, die eine sexuelle Reifung bewirken, sind bis heute noch nicht eindeutig geklärt: Die von den Keimdrüsen produzierten Sexualhormone bewirken einmal die embryonale Differenzierung und die pubertäre Entwicklung der Geschlechtsorgane, zum anderen die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale.

Unzweifelhaft finden dabei Änderungen im ZNS-Hypothalamus-Hypophysen-Gonadensystem statt, die einen hemmenden oder fördernden Einfluß auf die Freisetzung von Gonadotropin-Releasing-Hormonen in Hypothalamus bewirken und in der Hypophyse durch Änderung der Ansprechbarkeit auf LH-RH eine zunehmende LH-und/oder FSH-Sekretion auslösen. Ebenso muß die zunehmende Empfindlichkeit der Gonaden auf Stimulation durch LH/FSH in Betracht gezogen werden wie auch eine Änderung der Bindungsaffinität von SHBG (6,26).

1.2. Testosteron und Androgenrezeptor

Das Wirkungsprinzip der Steroidhormone läßt sich als Aktivierung bestimmter Genorte verstehen, wobei der Hormon-Rezeptor-Komplex sich mit einem Repressormolekül verbindet. Die bis dahin blockierte DNA wird frei, die Synthese von messenger-RNA beginnt und die Produktion von Enzymproteinen an den Ribosomen läuft an (11).

Als eigentliche Hodenhormone sind Testosteron und das 4-Androsten - 3,17 - dion anzusehen. Sie werden in den Zwischenzellen des Hodens aus Hydroxyprogesteron gebildet (12).

Testosteron wird am Wirkungsort durch 5α-Reduktase mit NADPH als Cosubstrat zu 5α-Dihydrotestosteron hydriert und zum Teil weiter zu 3α- oder 3β-Androstandiol reduziert (1). Die Androstandiole werden nicht gebunden und Testosteron im Vergleich zu DHT nur zu 10%, so daß für die Bindung an den Rezeptor nur DHT von Bedeutung ist (20,21).

Der Androgenrezeptor wurde im ventralen Prostatalappen gefunden (4, 22, 34). Er ist ein saures Glycoprotein, das bei 4,5 S sedimentiert und bei niedriger Ionenstärke zu 8 S Addukten aggregiert. Die Wärmeempfindlichkeit in vitro ist sehr groß. In Anwesenheit von Pyridoxalphosphat oder anderen Schiff'schen Basen bildenden Reagenzien geht seine Fähigkeit, sich an Chromatin oder DNA binden zu können, verloren, weswegen vermutlich zur Bindung an das Chromatin freie Aminogruppen notwendig sind (7). Die Affinität von DHT zum Rezeptor ist sehr hoch, die Konzentration des Rezeptors dagegen niedrig: In der Prostata der Ratte wird die Bindungskapazität mit 60 fmol/mg cytoplasmatisches Protein angegeben (2). Etwa 80% der Androgenrezeptoren sind im Zellkern lokalisiert.

1.3. Quantitative Bestimmung des Androgenrezeptors

Es gibt verschiedene Methoden, nach denen Androgenrezeptoren bestimmt werden (2,28). Bei der gebräuchlichsten - deshalb auch hier verwendet - wird der Rezeptor in der Zellfraktion oder im Gewebehomogenat mittels eines radioaktiven Liganden markiert und die Radioaktivität des Hormon-Rezeptor-Komplexes gemessen. Die quantitative Markierung des Rezeptors und die Separierung von ungebundenen und unspezifisch gebundenen Liganden vor der Radioaktivitätsmessung machen die Schwierigkeiten dieser Methode deutlich. In Kapitel 4.4. wird darüber berichtet.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit soll es sein aufzuzeigen, welche Wirkung HCg (Primogonyl®) auf die Konzentration des Androgenrezeptors, das Prostatagewicht pro Tier, die Protein- und DNA-Konzentration pro Tier bzw. pro mg Prostata während der sexuellen Reifung der Ratte hat.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Die Tiere stammten von der Tierzucht Ivanovas, Kissleg/Allgäu. Es handelte sich um männliche Auszuchtratten des Stammes Wistar. Verwendet wurden 4 verschiedene Altersgruppen, die in je 4 Untergruppen geteilt wurden.
Um sich eingewöhnen zu können, wurden die Tiere jeweils 3 Tage vor dem Beginn der Versuche angeliefert. Sie wurden in einem vollklimatisierten Tierstall bei 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit, bei Trockenfutter (Altromin) und Wasser ad libitum gehalten.
Um sicherzustellen, daß pro Teilversuch zumindest ein Prostatagesamtgewicht von 300 mg erhalten werden konnte, mußte für die verschiedenen Altersgruppen eine unterschiedliche Anzahl Tiere verwendet werden.

1. 30-Tage Tiere: 4 Gruppen à18 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit HCg behandelt wurden
2. 35-Tage Tiere: 4 Gruppen à16 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit HCg behandelt wurden
3. 40-Tage Tiere: 4 Gruppen à12 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit HCg behandelt wurden
4. 45-Tage Tiere: 4 Gruppen à10 Tiere
   a) 1 Kontrollgruppe
   b) 3 Gruppen, die mit HCg behandelt wurden

Bei Versuchseintritt waren die Tiere 25, 30, 35 bzw. 40 Tage alt.
Um die Hormondosis in Bezug auf das Körpergewicht gleich halten zu können, wurden die Tiere vor Behandlungsbeginn gewogen. Ein signifikanter Gewichtsunterschied innerhalb der einzelnen Altersgruppen ließ sich nicht feststellen.
Mit Ausnahme der Kontrolltiere wurde allen anderen Tieren täglich zwischen 13.00 Uhr und 13.30 Uhr je 0,1 ml HCg subcutan injiziert.
Am 5. Tag wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, das Blut wurde gesammelt, zentrifugiert, das gewonnene Plasma abpipettiert und bei -10°C zur späteren Testosterongehaltsbestimmung eingefroren.
Anschließend wurde die Prostata entnommen, die zuvor von Bindegewebe und Fett freipräpariert worden war, und in abgewogenen, gekühlten Teflonkapseln (Schüttelbehälter, Braun Melsungen) gelagert.
Während der Entnahme der Prostatae wurden die Teflonkapseln immer wieder in flüssigem N_2 gekühlt und dann bis zur Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

2.1.1. Herstellung der Injektionslösung von HCg

Da Tiere verschiedener Gewichtsgruppen jeweils das gleiche Volumen (0,1 ml) Hormonlösung erhielten, mußte die Konzentration der HCg-Lösung so verändert werden, daß die Dosis des Hormons pro Gewichtseinheit gleich war. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 250 IE/kg in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst.
Eine Verdünnung der Lösung erfolgte nach folgender Formel:

$$10 \times \frac{100}{\bar{g}} \text{ ml}$$

$\bar{g}$ = durchschnittliches Körpergewicht der Tiere pro Altersgruppe

Das Injektionsvolumen von 0,1 ml enthält somit 250 IE/kg Körpergewicht.

2.2. Chemikalien

Die bei den Versuchen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen und hatten den Reinheitsgrad "pro analysi".

2.2.1. Humanes Choriongondatropin

HCg (Primogonyl^{R}) Amp à250 IE
Fa. Schering Berlin/Bergkamen

2.2.2. Radioaktives Steroid

5α - Dihydrotestosteron NET 302 0,25 mCi
{ 1,2 - 3 H (N) } - (5α-Androstan-17β-OL-3-on)
40 Ci/m mol
Fa. New England Nuclear Corp.
Die Substanz lag in einer Benzol-Äthanol-Lösung vor (9 : 1 Vol:Vol). Dieses Gemisch wurde eingedampft und mit reinem Äthanol wieder gelöst. Aus der Stammlösung wurde dann die endgültige Arbeitslösung verdünnt

10µl ≙ 157 800 cpm

2.2.3. Radioinertes Hormon

Methyltrienolon ≙ R1881
Fa. New England Nuclear Corp.

2.2.4. Übrige Substanzen

1. NAD-ase
   (from N.crassa, Aktivität 0,86 IU/mg Protein; enthalten pro vial 2 mg)
   Fa. Sigma (München)

2. Michaelispuffer
   - 5,5 Diethylbarbitursaures Natriumsalz 44,6 g /5l
   - Natriumacetat 29,4 g /5l
   - NaN_3 0,7 g /5l
   - 1N HCl 60 ml/5l

   Einstellung auf pH 8,2 bei 4°C mit $HCl_{conc.}$

3. Trispuffer
   - 0,01 M Tris 6,06 g/5l
   - 0,005 M NaN_3 1,63 g/5l

   mit 25%iger HCl auf pH 7,5 bei 4°C eingestellt.

4. DST-Puffer
   - 0,05 M Dithioerythrit 771 mg/100 ml Trispuffer
   - 0,25 M Saccharose 8,55 g/100 ml Trispuffer

2.3. Radioaktivitätsmessung

Die β-Aktivität wurde mit dem Gerät Betaszint BF 5003 A /Berthold, Bad Wildbad) mit 62 % Zählausbeute gezählt mit einem Background von 16 cpm. Als Szintillationsflüssigkeit wurde Unisolve 1 (Fa. Zinsser, Frankfurt) verwendet.

2.4. DNA-Bestimmung

Die DNA wurde nach der Methode von Burton (3) bestimmt. Als Standard wurde jedoch Desoxyribose verwendet.

2.5. Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung wurde die von Moeller (24) abgewandelte Methode von Schaffner und Weissmann (29) verwendet.
Es wurden 2 x 5 µl der Proben auf eine Zellulose-Acetat-Folie (Membranfolie, Katalog Nr. 11 200, Satorius, Göttingen) pipettiert. Die Proben wurden an der Luft getrocknet und bis zur Proteinbestimmung gelagert.

Die Folien wurden 10 Minuten in Färbelösung inkubiert (1 g Amidoschwarz 10 B, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, 450 ml H_2O), dann 3 x 3 Minuten mit Entfärbelösung (900 ml Methanol), 20 ml Essigsäure, 80 ml H_2O) behandelt. Die noch gefärbten Proteinflecken wurden aus der Folie herausgeschnitten und in je einem Reagenzglas mit je 1 ml "Verreißlösung" aufgelöst (100 g Trichloressigsäure, 800 ml Ameisensäure, 100 ml Essigsäure). Die Messung der Extinktion erfolgte bei 620 nm, wobei als Standard Serumalbumin vom Rind (trocken, reinst, Behring Batch A 1003) diente. Die Standardkurve zeigte im Bereich von 0 bis 20 µg einen linearen Verlauf.

2.6. Steroidrezeptoranalyse

Homogenisierung und Fraktionierung
Zur Analyse des markierten Steroidrezeptors wurde die Methode Wagner (37, 39), von Moeller et. al. (23, 25) abgewandelt, angewendet, wobei die Agarelektrophorese bei -6°C eingesetzt wurde.

Mit Hilfe des Mikrodismembranators (Braun, Melsungen) wurden die in den Teflonkapseln tiefgefrorenen Prostatae mittels einer Wolfram-Karbid-Kugel von 10 mm Durchmesser homogenisiert.
Um eine Erwärmung des Gewebes über 0°C zu vermeiden, wurden die Teflonkapseln mit den Prostatae vor Beginn der Homogenisierung nochmals in flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurden die Kapseln in den Dismembranator gespannt und mit einer Frequenz von 50 Hz drei Mal 30 Sekunden kräftig geschüttelt, wobei nach je 30 Sekunden erneut in N_2 gekühlt wurde. Die weitere Verarbeitung des Gewebes wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, wobei die zu benützenden Materialien (Spritzen, Spatel, Zentrifugenröhrchen ect.) über Nacht im Kühlraum bereitgestellt wurden.

Den so pulverisierten Prostatae wurden pro Gewichtsanteil, der durch Wägung im tiefgefrorenen Zustand ermittelt wurde, 4 Volumenteile DST-Puffer zugesetzt, wodurch das Pulver dann langsam bei 0 bis 4°C auftaute.
Um zu vermeiden, daß aus ^{3}H-DHT ^{3}H-Androstandiol als Stoffwechselprodukt entsteht, wurde dem DST-Puffer NAD-ase zugesetzt (24, 25).
Der aufgetaute Inhalt der Kapseln wurde durch 10maliges Aufsaugen und Zurückdrücken in eine Einwegspritze über einen ca. 6 cm langen Plastikschlauch in den DST-Puffer suspendiert. Zugleich war darauf zu achten, daß weder eine Erwärmung der Suspension durch die Finger noch eine Blasenbildung durch zu schnelles Suspendieren erfolgten.
Anschließend wurde die Suspension bei 100 000 g und 2°C (40 000 rpm im Rotor 50 Ti, Ultrazentrifuge Spinco L2/65B, Beckmann Instruments, München) zentrifugiert. Dabei wurde die Suspension aufgetrennt in eine Lipidschicht, das Cytosol (Sap), und als Bodensatz das Pellet. Mit einer Lumbalkanüle wurden das Cytosol entnommen, die Lipidschicht verworfen, und aus dem Pellet später die DNA bestimmt. Zur Proteinbestimmung wurden 2 x 5µl , zur Androgenrezeptoranalyse 4 x 50µl Cytosol verwendet.

2.7. Inkubation

Zur Markierung der Androgenrezeptoren wurden zwei Ansätze bei + 4°C parallel inkubiert. Dabei wird Ansatz 1 als nicht supprimierter oder auch "heißer" Ansatz 2 als supprimierter oder "kalter" Ansatz bezeichnet.

	Ansatz 1	Ansatz 2
$2{,}89 \cdot 10^{-7}$M ^{3}H-DHT in Trispuffer	20µl	20µl
Trispuffer	20µl	- µl
$4 \cdot 10^{-5}$M R1881 in Trispuffer	- µl	20µl
Cytosol	200µl	200µl
DST-Puffer	160µl	160µl

Nach 1 Stunde bzw. 24 Stunden wurden das Inkubat mit der Agarelektrophorese weiterverarbeitet, wobei nach 1h Inkubation die Menge des radioaktiv markierten freien Rezeptors und nach 24h die Gesamtrezeptormenge in den Fraktionen gemessen wurde (24).

2.8. Elektrophorese

Folgende Geräte wurden bei der Elektrophorese benutzt:
- Vorrichtung zum Plattengießen; Fa. Hölzel, Dorfen
- Gelplattenschneidegerät; Fa. Hölzel, Dorfen
- Netzanschlußgerät 121 280; Fa. DESAGA, Heidelberg
- Kühlapparatur; Fa. Haake

Glasplatten, 85 x 100 x 0,7 mm groß, wurden mit Methanol entfettet. Auf die so gereinigten Platten wurden aus einer heißen Lösung von 100 mg Agar purum und 200 ml Aqua dest je 7 ml pipettiert und dann im Trockenofen bei 100°C eine Stunde lang getrocknet. Zur Herstellung der Agarplatten wurde eine heiße, klare Lösung aus 1,1 g Agar purum, 0,12 g Agarose, 68 ml Michaelispuffer (0,05 M) und 67 ml Aqua dest. angesetzt.
Die Glasplatten wurden mit der beschichteten Seite nach oben in die Gießform für Agarplatten gelegt und die waagerecht stehende Form mit der heißen Lösung gefüllt. Die abgekühlten, gelierten Platten wurden spätestens nach 24 Stunden verwendet.
Um eine ausreichende Kühlung der Agarplatten während der Elektrophorese sicherzustellen, wurde das Gerät eine Stunde vorher eingeschaltet. Die Puffergefäße wurden mit Michaelispuffer (0,05 M) gefüllt und mit Filterpapier als Ionenbrücken beschickt. Die zurechtgeschnittenen und gestanzten Agarplatten wurden so in das Gerät eingelegt, daß die überstehenden Ränder mit den Ionenbrücken in Kontakt kamen. In die Stanzlöcher wurden jeweils 50µl des Cytosols pipettiert. (Startloch 2,3 und 4 "heißer Ansatz"; Startloch 6,7 und 8 supprimierter Ansatz).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Agarplatte mit der kathodischen Seite nach hinten in den Schneideapparat gesetzt und in 10 Bahnen parallel zur Feldrichtung und 26 Fraktionen von 3 mm senkrecht zur Feldrichtung geschnitten. Die Fraktionen wurden nach folgendem Schema in die Zählröhrchen (Fa. Zinsser, Frankfurt) gefüllt:

Fraktion	1 + 2	:	Röhrchen 1
Fraktion	3	:	Röhrchen 2
Fraktion	4	:	Röhrchen 3
Fraktion	14	:	Röhrchen 13
Fraktion	15 - 16	:	Röhrchen 14
Fraktion	17 - 18	:	Röhrchen 15
Fraktion	19 - 20	:	Röhrchen 16
Fraktion	21 - 22	:	Röhrchen 17
Fraktion	23 - 26	:	Röhrchen 18
Startlochflüssigkeit		:	Röhrchen X

Den Röhrchen wurden je 10 ml Unisolve 1 als Szintillationsflüssigkeit zugesetzt. Bis zur Zählung in einem β-Zähler wurden die Proben mindestens 24 Stunden stehen gelassen, damit die Flüssigkeit in das Gel aufgenommen werden konnte.

2.9. Auswertung der Agarelektrophorese

Die Radioaktivität der Fraktionen 1-26 zeigte auf der Anodenseite einen Peak A_1 des nicht supprimierten ("heißen") Ansatzes und einen Peak A_2 des supprimierten Ansatzes. Die kathodische Seite wies den Peak B_1 und B_2 der entsprechenden Ansätze auf (Abb. 1).
Die Differenz von Peak A_1 und A_2 gilt als supprimierbare Bindung und ist zugleich ein Maß für die spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im nicht supprimierten Ansatz. Um die Auswirkungen von kleinen Pipettierfehlern möglichst gering zu halten, wurden die Werte der supprimierbaren Bindung nach einer von

Oettling (27) entwickelten Formel wie folgt korrigiert:

$$\Delta \text{ corr} = A_1 - (A_2 . B_1/B_2)$$

Aus den korrigierten Werten wurde der freie Rezeptor berechnet.

$$\Delta \text{corr} \times 8{,}4536 \times 10^{-18} = \text{mol}/50\mu\text{l}$$

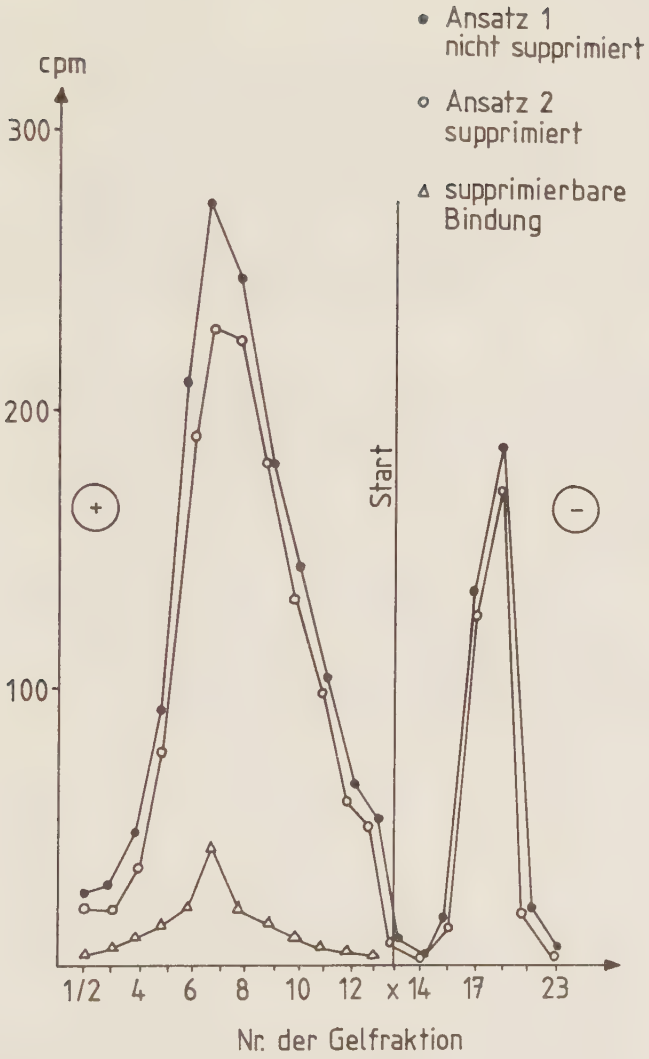

Abb. 1

Fraktionierung der Agargelplatten nach der Elektrophorese. Die Auswertung ist im Text erläutert.

3. Ergebnisse

Im Unterschied zu dem unter 2.1. beschriebenen Versuchsaufbau weisen die folgenden Tabellen jeweils drei Kontrollgruppen auf anstatt nur einer.
Parallel zu diesem Versuch liefen zwei weitere, vom Aufbau her gleiche Versuchsreihen mit Tieren gleichen Alters und auch gleicher Anzahl, jedoch unterschiedlicher Hormonbehandlung, so daß sich die Übernahme der Werte der Kontrollgruppen aus den beiden anderen Versuchsreihen anbot.

Die Tabellen im Anschluß beinhalten die primären Ergebnisse (Tabl. 1-4) und die daraus abgeleiteten Werte (Tabl. 5-8). Eine Codierung ist den Tabellen vorangestellt. Teilweise wurden die Ergebnisse der besseren Übersicht wegen graphisch dargestellt.

Erläuterungen zu den Tabellen 1 bis 4

I	Alter der Versuchstiere in Tagen
II	Anzahl der Tiere pro Teilversuch
III	Prostatagesamtgewicht in mg pro Teilversuch
IV	Prostatagewicht in mg pro Tier
V	Cytosol in µl pro Teilversuch
VI	Cytosol in µl pro Tier
VII	Protein in µg pro 50µl Inkubat
VIII	Protein in µg pro Tier
IX	DNA-Menge in µg pro Tier
X	freier Rezeptor in f-mol pro 50µl Inkubat (1h Inkubation)
XI	gesamter Rezeptor in f-mol pro 50µl Inkubat (24h Inkubation)

K	Kontrolltiere
B	mit HCg behandelte Tiere
X_1	Mittelwert der Kontrolltiere
X_2	Mittelwert der mit HCg behandelten Tiere
S_1	Standardabweichung bei den Kontrolltieren
S_2	Standardabweichung bei den HCg behandelten Tieren

Tabelle 1

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	s_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	s_2
I	30	30	30			30	30	30		
II	18	18	18			18	18	18		
III	380	340	355	358,3	20,2	745	630	720	698,3	60,4
IV	23,75	18,88	19,72	20,78	2,6	41,38	35,0	40,0	38,79	3,3
V	1900	1700	1775	1791,60	101,0	3725	3150	3600	3491,6	3,0
VI	118,75	94,44	98,60	103,93	13,0	206,90	175,0	200,0	193,9	16,7
VII	192,50	150,00	137,50	160,00	25,8	195,00	185,00	185,00	188,3	5,7
VIII	457,19	283,32	271,15	337,22	104,0	806,91	647,5	740,0	731,47	80,0
IX	72,50	71,66	65,00	69,72	4,1	73,33	118,3	125,3	105,64	28,2
X	1,65	2,25	4,25	2,72	1,3	3,36	4,19	3,96	3,84	0,4
XI	1,78	2,95	4,94	3,22	1,6	2,82	3,17	4,09	3,36	0,6

Tabelle 2

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	35	35	35			35	35	35		
II	16	16	16			16	16	16		
III	680	617	634	643,6	32,5	860	855	875	863,3	10,4
IV	38,0	38,56	39,62	38,72	0,8	53,75	53,44	54,68	53,95	0,6
V	3400	3085	3170	3218,3	162,9	4300	4275	4375	4316,6	52,4
VI	188,8	192,8	198,1	193,24	4,6	268,75	267,19	273,44	269,8	3,2
VII	202,5	-	232,5	217,5	21,2	265,0	250,0	270,0	261,6	10,4
VIII	764,6	-	921,3	842,95	110,7	1424,4	1335,9	1476,5	1412,27	71,0
IX	94,7	108,75	126,56	110,0	15,9	133,13	111,56	128,44	124,37	11,3
X	0,57	-	3,12	1,84	1,8	2,04	1,99	-	2,01	0,4
XI	1,41	3,38	3,65	2,81	1,2	2,55	2,74	2,58	2,62	0,1

Tabelle 3

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	40	40	40			40	40	40		
II	12	12	12			12	12	12		
III	600	470	505	525,0	54,9	820	850	840	836,6	15,2
IV	50	39,16	42,1	43,75	5,6	68,3	70,8	70,0	69,7	1,8
V	3000	2350	2525	2625,0	336,3	4100	4250	4200	4183,3	76,3
VI	250	195,8	210,4	218,74	28,0	341,6	354,16	350,0	348,6	6,3
VII	260	260	245	255	8,6	220	255	230	235	18,0
VIII	1300	1018,31	1031,0	1116,44	159,1	1503,3	1806,2	1610	1639,83	153,6
IX	122,5	140,0	120,0	127,5	10,9	152,5	160,0	150,0	154,16	5,2
X	0,085	2,11	3,88	2,02	1,9	1,76	0,89	2,89	1,84	1,0
XI	0,47	2,66	3,97	2,36	1,7	3,66	1,48	3,84	2,9	1,3

Tabelle 4

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	s_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	s_2
I	45	45	45			45	45	45		
II	10	10	10			10	10	10		
III	570	518	442	510	64,3	1015	1015	895	975	69,2
IV	57	51,8	44,2	51,0	6,4	101,5	101,5	89,5	97,5	6,9
V	2850	2590	2210	2550	321,8	5075	5075	4475	4875	346,0
VI	285,0	259,0	221,0	255,0	32,1	507,5	507,5	447,5	487,5	34,6
VII	260	262,5	255,0	259,1	3,8	270	250	220	246,6	25,1
VIII	1482	1359,75	1127,1	1322,95	180,2	2740,5	2537,5	1969,0	2415,6	399,9
IX	109,5	146,25	129,0	128,25	18,3	213	217,5	220,5	217,0	3,7
X	1,71	1,45	2,59	1,92	0,6	-	0,5	0,49	0,495	0,1
XI	0,71	2,40	2,42	1,84	0,9	3,06	0,53	2,29	1,96	1,3

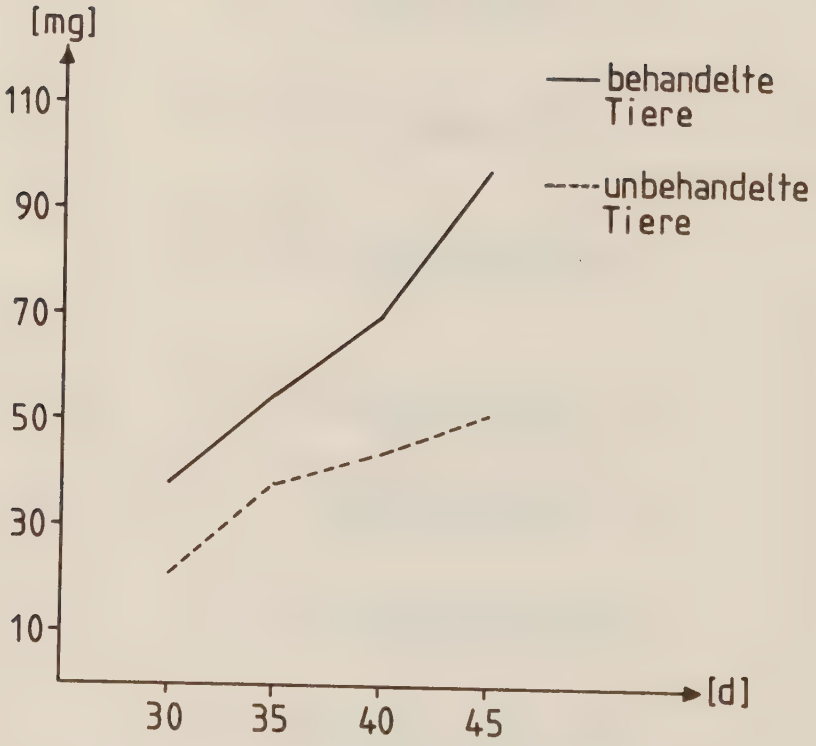

Abb. 2
Durchschnittliches Gewicht des ventralen Prostatalappens in mg bezogen auf ein Tier je Altersgruppe.

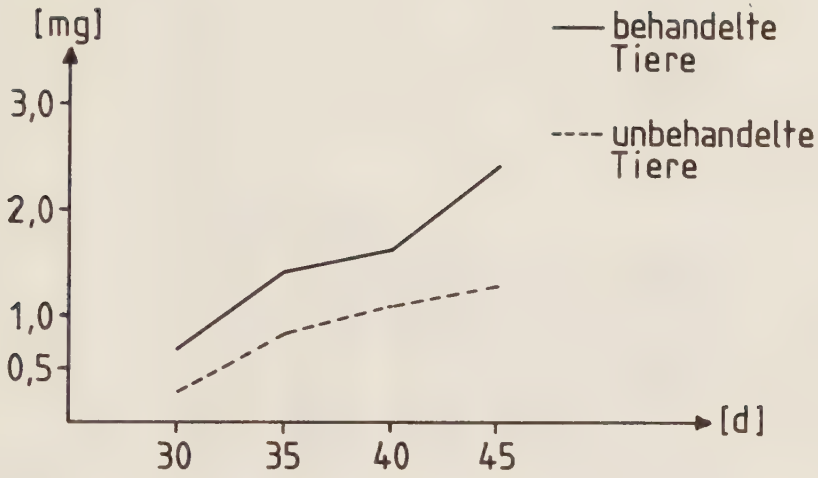

Abb. 3
Durchschnittlich cytosolisches Protein in mg bezogen auf ein Tier je Altersgruppe.

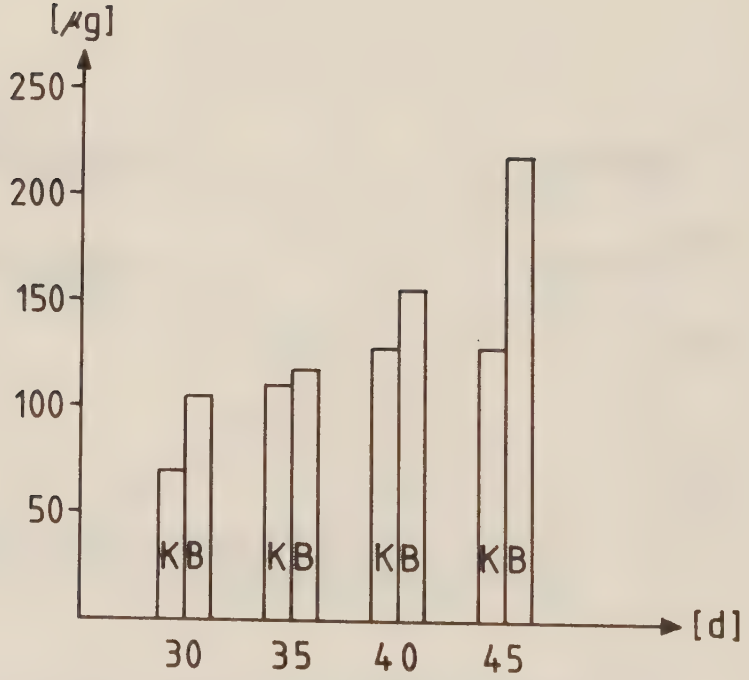

Abb. 4
Durchschnittliche DNA-Menge in µg bezogen auf ein Tier je Altersgruppe.

Erläuterungen zu den Tabellen 5 bis 8

I	Alter der Versuchstiere in Tagen
II	supprimierbare Bindung pro Einzelprostata (fmol/Tier)
III	supprimierbare Bindung pro mg Prostata (fmol/mg)
IV	supprimierbare Bindung pro mg cytosolisches Protein (fmol/mg)
V	supprimierbare Bindung pro mg DNA (fmol/mg)

K	Kontrolltiere
B	mit HCg behandelte Tiere
X_1	Mittelwerte der Kontrolltiere
X_2	Mittelwerte der mit HCg behandelten Tiere
S_1	Standardabweichung bei den Kontrolltieren
S_2	Standardabweichung bei den mit HCg behandelten Tieren

Tabelle 5

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	30	30	30			30	30	30		
II	14,01	15,1	29,8	19,6	8,8	49,24	52,15	56,4	52,59	3,6
III	0,59	0,8	1,51	0,96	0,4	1,19	1,49	1,41	1,36	0,1
IV	30,55	53,0	111,77	65,10	41,9	61,23	81,43	75,94	72,87	10,4
V	170,43	210,0	457,0	279,1	155,2	682	437	446	521,67	138,9

Tabelle 6

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	35	35	35			35	35	35		
II	7,2	-	43,79	25,58	26,0	38,86	37,84	117,01	64,57	45,4
III	0,2	-	1,11	0,66	0,6	0,72	0,70	2,14	1,18	0,8
IV	9,9	-	47,74	28,8	26,7	27,28	28,32	79,33	44,9	29,7
V	71,79	-	352,0	211,89	198,1	295	345	931	523,62	353,6

Tabelle 7

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	40	40	40			40	40	40		
II	1,5	29,37	58,09	29,6	28,3	42,82	22,08	59,85	41,58	18,9
III	0,03	0,75	1,38	0,72	0,6	0,62	0,31	0,85	0,59	0,5
IV	1,15	30,0	56,4	29,2	27,6	28,5	12,2	37,1	25,9	12,6
V	12,24	211,0	485,0	236,0	237,3	278,0	138,0	397,0	271,0	129,6

Tabelle 8

	K					B				
	1	2	3	$\bar{x}_1$	S_1	1	2	3	$\bar{x}_2$	S_2
I	45	45	45			45	45	45		
II	34,77	25,9	40,6	33,75	7,4	334,9	18,2	15,2	122,7	183,7
III	0,61	0,5	0,92	0,68	0,2	3,3	0,18	0,17	1,2	1,8
IV	23,31	19,8	36,0	26,4	8,5	122,4	7,2	7,9	45,83	66,3
V	318,95	186,0	316,0	273,7	75,9	-	83,0	71,0	77,0	8,4

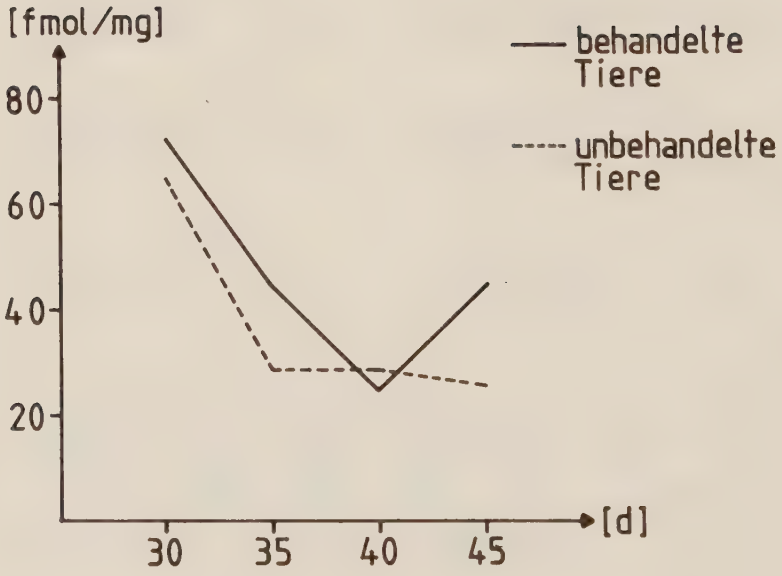

Abb. 5
Supprimierbare Bindung von ^{3}H-DHT in fmol bezogen auf ein mg Prostata.

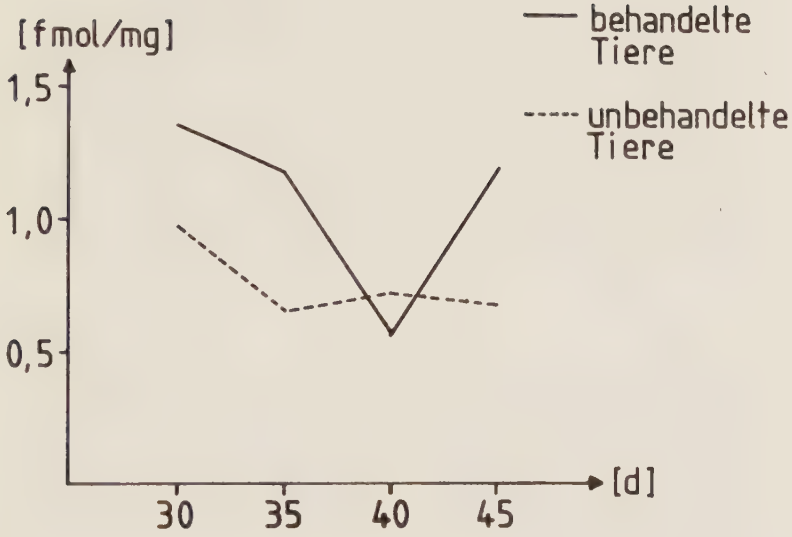

Abb. 6
Supprimierbare Bindung von ^{3}H-DHT in fmol bezogen auf ein mg cytosolisches Protein.

4. Disskussion

4.1. Tiere

Die Tiere wurden nicht im eigenen Labor gezogen, sondern über eine Firma bezogen, wobei eine gewisse Unsicherheit im genauen Alter der Tiere besteht. Die bei den Werten der Kontrollgruppen erkennbaren, zum Teil deutlichen Unterschiede lassen sich dadurch erklären, daß Werte von zwei parallel laufenden Versuchsreihen mit Tieren gleichen Alters übernommen wurden. Ein signifikanter Unterschied im Gewicht innerhalb der einzelnen Altersgruppen war jedoch nicht festzustellen.

4.2. Aufbewahrung der Prostatae

Die Prostatae wurden als ganzes Organ bei - 70°C aufbewahrt. Bei höheren Temperaturen waren schon innnerhalb weniger Tage erhebliche Rezeptorverluste zu verzeichnen (24,8).

4.3. Homogenisierung

Die Homogenisierung der Prostatae erfolgte in einem Mikrodismembranator, weil die Ausbeute an meßbarem Rezeptor von der Art der Homogenisierung des Gewebes abhängig ist. Wagner und Jungblut (38) erzielten mit dieser Methode die höchste Ausbeute an meßbarem Rezeptor.
Weil der Rezeptor in vitro sehr wärmeempfindlich ist, mußte das Gewebe zwischen den Arbeitsgängen in flüssigem Stickstoff gekühlt werden, da bei einer Erwärmung über 4°C nachweislich ein Rezeptorverlust eintritt (24,27).

4.4. Markierung des Rezeptors

Die quantitative Markierung des Rezeptors ist einmal mit ^{3}H-R1881, zum anderen mit ^{3}H-DHT möglich.
R1881 wird von Progestinrezeptoren gebunden. Die relative Affinität zum Progestinrezeptor ist höher als zum Androgenrezeptor.
Bei der Markierung des Rezeptors durch ^{3}H-DHT ist zu beachten, daß DHT nicht nur vom Rezeptor, sondern auch von SHBG mit großer Affinität gebunden wird. Von Bedeutung ist außerdem, daß DHT während der Inkubation zu 5α-Androstandiolen hydriert wird. Diese Androstandiole können vom Rezeptor nicht mehr gebunden werden. Um diese Konversion auszuschalten, wurde dem Inkubat zuvor NAD^{+}-Nukleosidase (E.C.1.1.1.50) zugefügt.

4.5. Inkubationszeit- und temperatur

Aufgrund der von Moeller (24) gefundenen Daten wurden folgende Inkubationszeiten gewählt:
60 Minuten und vierundzwanzig Stunden zur Bestimmung des schnell bzw. langsam markierbaren Anteils des Rezeptors.
Die Inkubationstemperatur wurde zwischen 0°C und 4°C gehalten, da bei höheren Temperaturen ein Rezeptorverlust eintritt.

4.6. Abtrennung des markierten Rezeptors

Der durch radioaktives Material markierte Rezeptor muß von ungebundenen oder unspezifisch gebundenen oder an SHBG gebundenen Liganden abgetrennt werden. Dies ist notwendig, damit die Radioaktivität des spezifisch gebundenen Liganden genau gemessen werden kann.
Jungblut u.a. (10) haben einen Vergleich der verschiedenen Trennverfahren veröffentlicht. Dabei fanden sie folgende relative Ausbeute bei der Bestimmung von rezeptorgebundenen ^{3}H-Oestradiol in Kalbsuterus und menschlichen Mammatumoren:

Methode	relative Ausbeute	
	Kalbsuterus	Mammatumor
Agarelektrophorese	100%	97%
Sephadex G 25	94%	100%
Aktivkohle	60%	48%
Dichtegradient	27%	29%
Protaminsulfat	10%	23%

nach Jungblut u.a. (10)

Nach diesen Ergebnissen kamen also nur die Agarelektrophorese und Sephadex G 25 für eine quantitative Analyse in Frage. Wagner (37) gebrauchte die Agarelektrophorese zur Charakterisierung von steroidgebundenen Proteinen und Steroidrezeptoren im Serum .
Die zu fraktionierende Probe wird in der Mitte eines elektrischen Feldes aufgetragen. Die an saure cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren gebundenen Liganden wandern bei pH 7,4 in Richtung der Anode, während die ungeladenen und ungebundenen Liganden durch einen endosmotischen Pufferstrom zur Kathode gespült werden. Im kathodischen Peak ist auch noch der größte Anteil der unspezifischen Liganden enthalten (Abb. 1).
An SHBG gebundene Liganden lassen sich in einem hiervon deutlich getrennten kathodischen Peak nahe dem Startloch finden.
Mit diesem Verfahren können also nukleäre und cytoplasmatische Rezeptoren deutlich von SHBG, ungebundenen Liganden und einem Teil der unspezifischen gebundenen Liganden getrennt werden.

Die Agarelektrophorese wird von Wagner (37, 39), Krieg (14. 15. 16. 17) Wagner und Jungblut (38), Voigt und Krieg (35), Voogt und Dingjan (36) und Kummer (18) angewandt.

Keines der in obiger Tabelle aufgeführten Trennverfahren ist in der Lage, eine vollständige Separierung der unspezifisch gebundenen Liganden von den spezifisch gebundenen zu erreichen. Deswegen muß noch ein weiteres Verfahren angewendet werden.

4.7. Supprimierung der spezifischen Bindung (24)

Die Tatsache, daß die Konzentration der Rezeptorbindungsstellen klein ("low capacity"), die der unspezifischen Bindungsstellen jedoch hoch ("high capacity") ist, wird zur Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung des markierten Liganden eingesetzt.
Parallel zu dem nicht supprimierten ("heißen") Ansatz (2.7.) wird ein supprimierter Ansatz gemacht, der außer dem markierenden radioaktiven Liganden noch unmarkierten Liganden (R1881) in 100-fachem Überschuß enthält. Die Bindung des radioaktiven Liganden an den Rezeptor ist in dem supprimierten Ansatz im Vergleich zum nicht supprimierten Ansatz auf 1% herunterverdünnt, während die unspezifische Bindung unbeeinträchtigt bleibt.

4.8. Bestimmungsmethode

Der Rezeptor wird mit ^{3}H-DHT markiert. Die Markierung ist spezifisch, da DHT von anderen steroidbindenen Proteinen nicht mit vergleichbarer Affinität gebunden wird. Nur SHBG macht hier eine Ausnahme. SHBG wird aber durch die Agarelektrophorese abgetrennt, so daß eine Störung nicht eintritt. Der 100-fache Überschuß von unmarkierten R1881 supprimiert in dem parallelen Ansatz die spezifische Bindung von ^{3}H-DHT. Die Differenz, die supprimierbare Bindung, wird als spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im heißen Ansatz betrachtet. Eine rechnerische Korrektur (27) verringert den systematischen Fehler bei der Berechnung der supprimierbaren Bindung.

4.9. HCg und seine Wirkung

HCg wird aus dem Urin schwangerer Frauen gewonnen und entspricht weitgehend dem im HVL gebildeten LH (ICSH).
Unter HCg nehmen Zellzahl und Zellgröße der Leydigzellen zu (19). Weiterhin soll HCg über eine intrazelluläre Erhöhung von Zyklo-AMP (3', 5'-AMP) einige Enzyme in den Leydigzellen und Tubuli seminiferi aktivieren (9, 31). Außerdem soll LH durch Einfluß auf die 20 α-Hydroxylierung des Cholesterins die Produktion der Vorstufen des Testosterons erhöhen (33).
Nachgewiesen ist die Wirkung des DHT, die A-Ring reduzierte Form des Testosterons, auf die Nukleinsäuresynthese des Prostatazellkerns (5). Es sind zwei mögliche Wirkungen bei der Stimulation durch HCg in Betracht zu ziehen: Zum einen ein vermehrtes Angebot an Testosteron, zum anderen die gesteigerte Empfindlichkeit der Prostata gegenüber Testosteron. In beiden Fällen ist eine Zunahme des Prostatagewichtes zu erwarten. Bekannt ist, daß die Testosteronkonzentration unter HCg-Einfluß steigt. Wenn auch die Empfindlichkeit steigt, ist eine Zunahme der Rezeptorkomplexkonzentration zu erwarten. Eine Tendenz zur Rezeptorkomplexkonzentrationssteigerung ist erkennbar, jedoch nicht signifikant.

4.10. Wachstum der Prostata

Bekannt ist, daß die Prostata der Ratte während der sexuellen Reifung in zwei Schüben wächst und zwar zwischen dem 20. und 30. Tag sowie zwischen dem 50. und 55. Tag (24). Ein Einfluß von HCg auf diese Wachstumsschübe konnte nicht nachgewiesen werden,da die hier behandelten Tiere zwischen 30 und 45 Tagen alt waren und während dieser Zeit das Prostatawachstum nahezu stagniert.

Gegenüber den unbehandelten Tieren ließ sich jedoch eine Zunahme des Prostatagewichtes feststellen, die bei den 30 Tage alten Tieren 94% über dem Mittelwert der Kontrollgruppen lag. Bei den 35 Tage alten Tieren war die Gewichtszunahme mit 34% am niedrigsten. Das Prostatagewicht nahm bei den 40 Tage alten Tieren um 59% zu und stieg bei den 45 Tage alten Tieren wieder bis auf 91% an (Abb. 2). Sunde (32) stimulierte die 7 α-Hydroxylase-Aktivität bei präpubertären Ratten in vivo durch LH und HCg. Bei einigen Tieren wurde die Prostata entnommen und gewogen. Die Tiere, die als Antwort auf die Hormonbehandlung eine signifikant höhere 7 α-Hydroxylase zeigten, wiesen auch ein deutliches höheres Prostatagewicht als die Kontrollgruppen auf.
Die Prostatae wachsen sowohl durch Vermehrung als auch durch Vergrößerung der Zellen, wie die Zunahme von DNA und Protein in den einzelnen Altersstufen zeigt.

4.11. Cytosolisches Protein und DNA nach HCg-Stimulation

Auch hier ist zum Teil eine recht deutliche Zunahme an löslichem cytosolischem Protein und an DNA im pellet bei den mit Hormon behandelten Tieren zu verzeichnen, Die höchste Zunahme an Protein bezogen auf ein Tier (Tab. 1-4, VIII) findet sich hier genau wie zuvor beim Prostatagewicht bei den 30 Tage alten Tieren mit 116% gefolgt von den 35 Tage alten Tieren mit 67%. Die niedrigste Zuwachsrate mit 46% wiesen die 40tägigen Tiere auf. Bei den 45 Tage alten Tieren stieg das cytosolische Protein wieder um 82% über den Mittelwert der unbehandelten Tiere. Betrachtet man die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen bei behandelten und unbehandelten Tieren, so zeigt sich, daß

die Konzentration zwischen dem 30. und 35. Tag am stärksten steigt, gefolgt von einem nicht ganz so steilen Anstieg zwischen dem 35. und 40. Tag. Der Anstieg der Konzentrationen zwischen den behandelten Tieren ist bis zu diesem Zeitpunkt als nahezu gleichsinnig anzusehen.
Zwischen dem 40. und 45. Tag steigt die Proteinkonzentration bei den behandelten Tieren deutlich höher als bei den unbehandelten.
Die DNA-Konzentration war bei allen mit HCg behandelten Gruppen signifikant höher ($p < 0,01$).
Innerhalb der Altersgruppen war bei den Kontrolltieren eine Abnahme der DNA-Konzentration vom 30. zum 45. Tage erkennbar; bei den behandelten Tieren dagegen stieg die Konzentration.

4.12. Supprimierbare Bindung und HCg

Die im Sap gemessene supprimierbare Bindung lag nach einer Stunde Inkubation bei den 30 Tage alten unbehandelten Tieren bei 0,9 fmol/mg Prostata bzw. 65 fmol/mg Protein und 279 fmol/mg DNA. Die Werte steigen bei den unbehandelten Tieren um 41%, 11% bzw. 86%. Bei den 35 Tage alten Tieren erfolgte ebenso ein Anstieg in den sogenannten 3 Bezugssystemen, der jedoch nicht ganz so deutlich war. In den beiden darauffolgenden Altersgruppen war kein Anstieg der Werte zu verzeichnen. Sie sanken sogar unter den Mittelwert der unbehandelten Gruppen.
Bezieht man die supprimierbare Bindung auf ein Tier, so zeigt sich, daß bei den Kontrolltieren eine Zunahme von 6 fmol zwischen dem 30. und 35. Tag und jeweils eine Steigerung von 4 fmol zwischen dem 35. und 40. sowie 40. und 45. Tag auftritt.
Bei den unbehandelten Tieren nimmt die Menge pro Tier im ersten Zeitraum um 12 fmol zu und sinkt dann zwischen dem 35. und 40. Tag um 23 fmol. Im letzten Zeitabschnitt ist ein Anstieg von 81 fmol zu verzeichnen.

Signifikante Unterschiede in den Tabellen 5 bis 8 zeigten lediglich die supprimierbare Bindung pro mg DNA bei den 35 und 45 Tage alten Tieren ($p < 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$) sowie die supprimierbare Bindung pro Einzelprostata bei den 35 Tage alten Tieren auf dem Niveau $p < 0,01$.

4.13. Rezeptorkomplexkonzentration und HCg-Einfluß

Die Konzentration (fmol/50µl) des schnell markierbaren Anteils des Rezeptorkomplexes (Tab. 1-4, X) zeigt bei den behandelten 30 Tage alten Tieren zwar einen deutlichen, jedoch nicht signifikanten Unterschied gegenüber den Werten der Kontrollgruppe. Die Konzentrationsänderung des langsam markierbaren Anteils bei den mit HCg gespritzten Tieren fällt im Vergleich zu den unbehandelten Tieren nahezu nicht ins Gewicht.
Bei den 35 Tage alten Tieren nimmt die Konzentration des Rezeptorkomplexes insgesamt, und zwar sowohl bei dem Wert der 1-Stundeninkubation, als auch bei dem der 24-stündigen Inkubation gegenüber der vorhergehenden Altersgruppe ab. Innerhalb der Altersgruppe liegt die Konzentration des schnell markierbaren Anteils der mit Hormon behandelten Tiere nur geringfügig über dem Wert der Kontrollgruppe, wohingegen sich die Ergebnisse bei dem langsam markierbaren Anteil des Rezeptorkomplexes gegenteilig verhalten.
Dabei ist der großen Streuung der Ergebnisse Beachtung zu schenken.
Bei den 40 Tage alten, unbehandelten Tieren stieg die Konzentration um 0,18 fmol/50µl, bei den behandelten Tieren sank die Konzentration beim 1h-Wert um 0,17 fmol/50µl und beim 24h-Wert um 0,74 fmol/50µl.

Die Ergebnisse der Rezeptorkomplexkonzentration bei den 45 Tage alten Tieren weisen sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit HCg behandelten Tieren eine solche Streuung auf, daß sich vergleichende Angaben über Zunahme bzw. Abnahme der Konzentration innerhalb dieser Altersgruppe und in Bezug auf die übrigen Altersgruppen nicht machen lassen.
Die in den Tabellen 1-4 dargestellten Werte der Rezeptorkonzentration zeigten sowohl bei dem schnell als auch bei dem langsam markierbaren Anteil des Rezeptorkomplexes keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit HCg behandelten und unbehandelten Tieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von humanen Choriongonadotropin auf den cytoplasmatischen Androgenrezeptor im ventralen Prostatalappen präpubertärer Ratten untersucht. Dabei wurden die Konzentration des Androgenrezeptors, der DNA und des cytosolischen Proteins im 100 000g Überstand gemessen und das Prostatagewicht bestimmt.

Dazu wurden 4 Gruppen männlicher Wistar Ratten im Alter von 30, 35, 40 und 45 Tagen mit 250 IE/kg Körpergewicht HCg behandelt.

Der Androgenrezeptor wurde durch Inkubation des Cytosols mit 3 x 10^{-7}M ^{3}H-DHT bei 0-4°C für 24h in Gegenwart von NAD-ase markiert und mit der Agarelektrophorese nach Wagner separiert. Unspezifische Bindung wurde durch Inkubation eines Parallelansatzes in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses an radioinertem Methyltrienolon identifiziert.

Die Applikation von humanem Choriongonadotropin erhöhte das Prostatagewicht bei allen Altersgruppen signifikant, am deutlichsten bei den 30 und 45 Tage alten Tieren. Auch bei der Protein- und DNA-Konzentration war eine Steigerung erkennbar, die statistisch jedoch nicht zu sichern war.

Die Konzentration des cytoplasmatischen Androgenrezeptors wies ein erstes Maximum bei den 35 Tage alten Tieren und ein zweites Maximum bei den 45 Tage alten Tieren auf. Die Behandlung mit HCg bewirkte einen Anstieg der Rezeptorkonzentration, die statistisch jedoch nicht gesichert werden konnte.

6. Anhang

Abkürzungen und Trivialnamen

Abb	Abbildung
B	mit HCg behandelte Tiere
cpm	counts per minute
d	Alter der Tiere in Tagen
DHT	s. Dihydrotestosteron
Dihydrotestosteron	17$^{\beta}$ Hydroxy-5$^{\alpha}$ -androstan-3-on
3H-DHT	radioaktiv markiertes Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
$\bar{g}$	durchschnittliches Körpergewicht pro Altersgruppe
HCg	humanes Choriongonadotropin (Primogonyl ®)
HVL	Hypophysen Vorderlappen
K	Kontrollgruppe; unbehandelte Gruppe
LH	luteinisierendes Hormon
Methyltrienolon	s. R1881
NAD-ase	NAD^+-Nukleosidase (E.C.3.2.2.5)
N_2	Stickstoff
pellet	Bodensatz nach dem Zentrifugieren
rpm	rounds per minute
R1881	17$^{\beta}$ -Hydroxy-17α -methyl-oestra-4, 9, 11-trien-3-on
Sap	100 000g-Überstand eines Gewebe-Puffer-Homogenats
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
Testosteron	17β -Hydroxy-4-androsten-3-on
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
$\bar{x}$	Mittelwert

Literaturverzeichnis

1. Baulieu, E.E., Lasnitski, I. and Robel, P. (1968):
Metabolism of testosterone and actions of metabolites on prostate glands in organ culture
Nature 219, 1115

2. Blondeau, I.P., Corpechot, C., le Grascogne, C., Beaulieu, E.E. and Robel, P. (1975):
Androgenreceptors in the Rat Ventral Prostate and their Hormonal Control
Vit. Horm. 33, 319 - 345

3. Burton, K. (1956):
A Study of the conditions and mechanisms of the diphenylamin reaction for the colometric estimation of desoxyribonucleic acid
Biochem. J. 62, 315 - 322

4. Fang, S., Anderson, K.M., and Liao, S. (1969):
Receptor proteins for androgens. On the role of specific proteins in the retention of 17 β-hydroxy-5 α -androstane-3-one by the rat ventral prostate in vivo and in vitro
J.biol.Chem. 244, 6584

5. Folman, Y., Ahmad, N., Sowell, I.G. and Eik-Nes, K.B. (1973):
Formation in vitro of 5 α -dihydrotestosterone and other 5α -reduced metabolites of ^{3}H-testosterone by the seminiferous tubules and interstitial tissue from immature and mature rat testes
Endocrinology 92, 41-47

6. Gupta, D. and Eichner, M. (1978):
An appraisal of the male hypothalamo-hypophyseal-gonadal acis in the rat during secual maturation.
in: Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology and Clinical Applications. Editors: Gupta/Voelter Verlag Chemie, Weinheim-New York, S. 257-285

7. Hiipakka, R.A. and Liao, S. (1980):
Effect of pyridoxal phosphat on the androgen receptor from rat prostate: inhibition of receptor aggregation and receptor binding to nuclei and to DNA-cellulose
J. Steroid Biochem. 13, 841 - 846

8. Høisaeter, P.A. (1973):
The androgen cytosol receptor in the ventral prostate of the rat. Methodological problems
Biochem. Biophys. Acta 317, 492.

9. Inano, H. and Tamaoki, B.-J. (1966):
Bioconversion of steroids in immature rat testes in vitro
Endocrinology 79, 579 - 590

10. Jungblut, W.P., Kallweit, E., Sierralta, W., Truit Anne, J., and Wagner, R.K. (1972):
Evaluation of various methods for the assay of cytoplasmic oestrogen receptors in ectracts of calf uteri and human breast cancers.
Acta endocrinol. 70, 185 - 195

11. Karlson, P., Doenecke, D., Sekeris, C. (1975):
Intracellular mechanisms of Hormone Action.
Comprehensive Biochemistry Vol 25, 1 - 63,

12. Karlson, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Thieme Verlag, Stuttgart (1977): 322, 323

13. Karlson, P. (1979):
Hormonrezeptoren und Hormonwirkung
Klin. Wschr. 57, 607 - 612

14. Krieg, M., Szalay, R. and Voigt, K.D. (1974):
Binding and metabolism of testosterone and of 5α dihydrotestosterone in bulbocavernous/levator ani of male rats: in vivo and in vitro studies
J. Steroid Biochem. 5, 453-459

15. Krieg, M., Bartsch, W., Herzer, S., Becker, H. and Voigt, K.D. (1977):
Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and sex hormone binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy
Acta endocrinol. 86, 200-215

16. Krieg, M., and Arning, C. (1978):
Quantitative determination of the binding capacity of the sex hormone-binding globulin, using agar gel elektrophoresis
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 429-434

17. Krieg, M., Grote, J., Voigt, K.D., Altenähr, E. and Klosterhalfen, H. (1978):
Human prostatic carcinoma: significant differences in its androgen binding and metabolism compared to the human benign prostatic hypertrophy
Acta Endocrinol 88, 397-407

18. Kummer, D. (1980):
Steroid receptor determination by means of agar gel elektrophoresis
Recent Results in Cancer Research 71, 14-15

19. Labhardt, A.:
Testis
in: Klinik der inneren Sekretion, 3. Auflage Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1978, S. 447-524

20. Liao, S., Liang, T., and Tymozko, J.L. (1972):
Structural recognitions in the interactions of androgens and receptor proteins and in their association with nuclear acceptor components
J. Steroid Biochem. 3, 401-408

21. Liao, S. Liang, T., Fang, S., Castaneda, E., and Shao, T.C. (1973):
Steroid structure and androgenic activity. Specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens
J. Biol. Chem. 248, 6154

22. Mainwaring, W.J.P. (1969):
A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate.
J. Endocrinol 45, 531

23. Moeller, H., Oettling, G., Fiederer, B. and Gupta, D. (1980):
5 α-dihydrotestosterone-receptors estimation through ^{3}H-5 α-dihydrotestosterone exchange
J. clin. chem. klin. biochem. 18, 726

24. Moeller, H.:
Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von ^{3}H-Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD^{+}-Nukleosidase
Attempto Verlag, Tübingen 1982

25. Moeller, H., Oettling, G., Fiederer, B. and Brügmann, G. (1983):
A quantitative assay for the cytoplasmic androgen receptors using ^{3}H-dihydrotestosterone in the presence of NAD^{+}-nucleosidase
Acta endocrinol. 102, 153-160

26. Odell, W.D. and Swerdloff, R.S. (1975):
The role of testicular sensivity to gonadotropins in sexual maturation of the male rat
J. Steroid Biochem. 6, 853 - 857

27. Oettling, G.:
Dissertation, Tübingen. In Vorbereitung

28. Pertschuk, L.P., Zava, D.T., Gaetjens, E., Macchia, R.J., Wise, G.J., Kim, D.S. and Brigati, D.J. (1979): Histochemistry of Steroid Receptors in Prostatic Diseases Ann. Clin. Lab. Sci. 9, 225 - 229

29. Schaffner, W., and Weisman, C. (1973): A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution Anal. Biochem. 56, 502 - 514

30. Schmidt, R.F. und Thews, G.: Physiologie des Menschen Springer-New York-Heidelberg-Berlin (1977): S. 651, 652

31. Shikita, M., and Hall, P.J. (1967): The action of human chorionic gonadotropin in vivo upon microsornal enzymes of immature rat testis Biochem Biophys. Acta 136, 484

32. Sunde, A., and Kristen, B. Eik-Nes. (1982): Stimulation in vivo of testicular 7α -hydroxylase activity in immature rats by LH and HCg J. Steroid Biochem. 17, 77-84

33. Tamm, J.: Testis in: Klinische Pathophysiologie, Hrsg: W. Siegenthaler Thieme Verlag Stuttgart 1973, S. 347-369

34. Unhjem, O., and Tveter, K.J. (1969): Localization of an androgen binding substance from the rat ventral prostate Acta endocr. (Kbh.) 60, 571

35. Voigt, K.D., and Krieg, M. (1978): Biochemical endocrinology of prostatic tumors. In: current topics in experimental endocrinology (eds: Martini, L. and James V.H.T.) Academic Press, New York, VolIII, p. 173-199

36. de Voogt, H.J., and Dingjan, P. (1978):
Steroid receptor in human prostatic cancer. A. preliminary evaluation.
Urol.Res. 6, 151 - 158

37. Wagner, R.K. (1972):
Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid binding serum proteins by agar gel electrophoresis at low temperature.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 1235 - 1245

38. Wagner, R.K., and Jungblut, P.W. (1976):
Oestradiol- and dihydrotestosterone receptors in normal and neoplastic human mammary tissue
Acta endoerinol. 82, 105 - 120

39. Wagner, R.K. (1978):
Extracellular and intracellular steroid binding proteins.
Acta Endocrinol. Suppl. 218

Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Moeller danke ich besonders für die Überlassung des Themas sowie die gewissenhafte Durchsicht meiner Manuskripte.
Auch den Mitarbeiterinnen der Abteilung für endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik, insbesondere Frau Goecke und Frau De Vusser, gilt mein Dank für die freundliche Unterstützung während meiner Labortätigkeit.

Lebenslauf

Am 27. Februar 1951 wurde ich, Peter Schönfeld, als zweiter Sohn des Bundesbahninspektors Friedrich Schönfeld und dessen Ehefrau Anna, geb. Lamberg in Mannheim geboren.
Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Grundschule und von 1961 bis 1966 zunächst das Lessing-Gymnasium in Mannheim. Danach wechselte ich in das Kurpfalz-Gymnasium, an dem ich im Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte.
Von 1971 bis 1973 leistete ich Dienst bei der Bundeswehr. Die Zeit von 1973 bis 1977 war ich bei einem Mannheimer Versicherungsunternehmen beschäftigt. Im Oktober 1977 immatrikulierte ich mich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen für den Studiengang Zahnmedizin.
Am 1. September 1978 verehelichte ich mich mit der Zahnarzthelferin Marianne Müller.
Die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Zahnärzte bestand ich im Oktober 1978, die zahnärztliche Vorprüfung im März 1980 und am 15. Dezember 1982 die zahnärztliche Prüfung.
Seit Januar 1983 bin ich als Assistent bei Zahnarzt Richard Müller in Mannheim angestellt.